

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Otorrinolaringologia

Otosclerose hereditária: a base genética

Maria Teresa Baptista Carvalho

ABRIL'2019



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Otorrinolaringologia

Otosclerose familiar: a base genética

Maria Teresa Baptista Carvalho

Dr. Marco António Alveirinho Cabrita Simão

ABRIL'2019

RESUMO

Otosclerose familiar é uma entidade conhecida há cerca de 150 anos, no entanto, pouco se continua a saber sobre a sua etiologia e fisiopatologia. Com recurso a tecnologia progressivamente mais inovadora e específica tem sido possível associarem-se algumas mutações em diferentes genes a esta doença, porém, até muito recentemente não tinha sido possível identificar-se um gene causador de doença. As técnicas de investigação moleculares também têm aqui um papel fundamental sendo que diferentes variantes do mesmo gene se podem traduzir por um mecanismo fisiopatológico comum, podendo ter, por isso, o mesmo alvo terapêutico. Assim, numa era em que a tecnologia evolui exponencialmente, espera-se que nos próximos anos seja conhecido mais, não só sobre se as variantes dos genes com forte associação são realmente ou não genes causadores de doença, mas também que tipo de mecanismo fisiopatológico despoletam. E com esta nova informação desenvolver e personalizar novas opções terapêuticas para esta doença, podendo possivelmente diminuir o número de cirurgias e dar uma resposta eficiente para quem tem otosclerose com uma componente predominantemente neurossensorial.

PALAVRAS-CHAVE

Otosclerose familiar; genes associados à doença; genética molecular;

ABSTRACT

Familial otosclerosis is an entity known for about 150 years, however, little is known about its etiology and pathophysiology. With progressively more innovative and specific technology it has been possible to associate some mutations in different genes to this disease, but until very recently it had not been possible to identify a gene that causes disease. Molecular research techniques also have a fundamental role here, and different variants of the same gene can be translated by a common pathophysiological mechanism, and may therefore have the same therapeutic target. Thus, in an era in which technology evolves exponentially, it is expected that in the next few years more will be known, not only whether the variants of genes with strong association are actually disease-causing genes or not, but also what kind of pathophysiological mechanism it triggers. And with this new information develop and customize new therapeutic options for this disease, possibly reducing the number of surgeries and giving an efficient response for those who have otosclerosis with a predominantly sensorineural component.

KEY-WORDS

Familial otosclerosis; disease-associated genes; molecular genetics;

ÍNDICE

Introdução	5
Genes	9
Ots	9
Col1A1	9
Angiotensina II.....	10
Tgf- β 1	11
Bmp2 e Bmp4	11
Reln	12
Serpinf1	12
Discussão	14
Conclusão	16
Bibliografia.....	17
Agradecimentos	20

INTRODUÇÃO

A otosclerose é uma causa relativamente comum de déficit auditivo no adulto jovem ^[1] e está associada a um impacto significativo nesta população ^[2], podendo a surdez resultante conduzir a isolamento social, depressão e declínio cognitivo ^{[3][4][5]}. Dado ser uma patologia com importantes comorbilidades com um impacto significativo na qualidade de vida destes doentes, as suas diferentes etiologias têm sido estudadas ao longo dos últimos anos, com o intuito preventivo através da identificação de indivíduos que poderão estar em risco e ainda ao nível das opções terapêuticas além das cirúrgicas ou próteses auditivas.

A otosclerose é uma doença caracterizada por uma progressiva surdez de condução associada a uma alteração da remodelação óssea do ouvido interno – uma anormal homeostase óssea dentro da cápsula ótica ^[6] que frequentemente envolve a articulação estribo-vestibular, levando à fixação da base do estribo e impedindo o seu normal movimento de interação com a endolinfa no ouvido interno ^{[7][8]}.

A otosclerose tem uma idade de apresentação variável, com uma perda de audição a surgir em média na 3ª década de vida, sendo que o quadro vai progressivamente agravando ^[1]. As alterações auditivas podem ainda ser detetadas tão precocemente como a partir da 1ª década de vida. ^[1, 9, 10] Note-se ainda uma maior prevalência no sexo feminino.

Esta entidade clínica é relativamente comum em europeus caucasianos, com uma frequência reportada de 0.1-2.1% ^[1, 9, 11]. É ainda comum entre indivíduos com descendência indiana, principalmente das população tribais do sul da Índia, cuja incidência reportada encontra-se entre 10 a 17% no século XX ^[12].

Na maioria dos casos, a surdez é bilateral (70-85%) e, geralmente, é assimétrica, desenvolvendo-se inicialmente num ouvido e progredindo posteriormente para o contralateral ^[1, 13, 14].

Otosclerose foi tradicionalmente abordada como uma doença do ouvido médio, mas o ouvido interno também pode estar afetado, resultando numa surdez mista ou neurosensorial pura, acufenos e, por vezes, vertigens, resultando então no quadro que denominamos por otosclerose clínica.

Em dois estudos realizados com cadáveres foi encontrada evidência histológica de otosclerose em 10% de caucasianos, no entanto apenas 12% destes tinha otosclerose clínica, sendo que estes resultados têm sido corroborados por estudos mais recentes^[14, 15].

Fisiopatologicamente, acredita-se que a otosclerose se estabeleça através de três fases: osteopongiose – lesões em que estão presentes histiocitos, osteoblastos e osteócitos que levam à absorção de osso em redor de vasos pré-existent resultando numa microcirculação maior –, remodelação – à medida que os osteoblastos se tornam mais envolvidos estes focos enriquecem em substância amorfa e adquirem um défice progressivo de colagénio, resultando na formação de novo osso esponjoso – e estabelecimento de osso otosclerótico – formação de osso denso, esclerótico nas áreas onde previamente se encontrava osso esponjoso, os espaços vasculares previamente dilatados nesta fase encontram-se estreitos devido à deposição óssea. A otosclerose tem início no osso endocondral e, à medida que a osteoespongiose e o esclerosamento continuam, o endóstio e o perióstio também são envolvidos^[13]. No entanto não se sabe que fator ou conjunto de fatores estarão na origem da perturbação que despoleta este processo, teorizando-se que será a interação multifatorial genética, ambiental, infecciosa, autoimune e/ou hormonal.

A etiologia da otosclerose continua a ser debatida com várias controvérsias, no entanto, existe concordância relativamente à importante preponderância da componente genética. Com os avanços tecnológicos nas últimas décadas tem sido possível progressivamente perceber mais sobre o genoma humano e as suas alterações que resultam, direta ou indiretamente, em doenças.

Em 1861, Toynbee reportou pela primeira vez surdez por otosclerose com padrão familiar. Em 1922, Albrecht foi o primeiro a concluir que a otosclerose podia ser herdada com um padrão autossómico dominante em algumas famílias, que foi posteriormente suportado, em 1960, por Larson que verificou uma penetrância incompleta, entre 25 e 40%, na maioria das famílias com padrão autossómico dominante^[13]. Assim o facto de parte significativa dos doentes (40-60%) terem história familiar comprovada e a suposição de que poderão existir mecanismos diferentes com o mesmo resultado fisiopatológico, levou a que determinados autores denominassem a doença com padrão de hereditariedade positiva de otosclerose familiar^[16].

No caso de um indivíduo jovem reportar uma perda auditiva progressiva predominantemente condutiva deve fazer suspeitar o diagnóstico de otosclerose, especialmente se o mesmo tiver história familiar desta patologia. Posteriormente, deverá realizar uma audiometria – onde evidenciar-se-á, geralmente, um déficit auditivo tipicamente de condução –, uma timpanometria – que revelará ausência de reflexos estapédicos – e posteriormente, se os resultados dos exames anteriores forem concordantes com a hipótese diagnóstica em questão, deverá realizar uma tomografia computadorizada para auxiliar no suporte do diagnóstico e para caracterizar a localização e a dimensão das lesões. A ressonância magnética também poderá ter indicação caso haja a suspeita de envolvimento da membrana labiríntica e/ou do vestíbulo ^[8, 17].

GENES

OTSC

Linkage analyses pode ser usada para identificação de localização de vários *loci* genéticos de mutações causadoras de doença. Esta técnica é utilizada para identificação do cromossoma onde se localizam as mutações e de fatores genéticos responsáveis pela segregação mendeliana de uma doença monogenética dentro de uma família. Geralmente, centenas a milhares de marcadores genéticos são segregados com a doença de interesse dentro da família. Depois do cromossoma onde o gene causador de doença estar identificado, o *locus* pode ser posteriormente refinado através de marcadores genéticos adicionais e de bases de dados descrevendo que genes se encontram nessa região. Seguidamente, genes candidatos dentro de um intervalo delineado, como genes que envolvem a homeostase óssea no desenvolvimento de otosclerose, são sujeitos a análises de mutações para identificar a mutação genética subjacente ^[18].

Foram elaboradas dez análises de *genome-wide linkage* em dez famílias com otosclerose monogenética com padrão de hereditariedade autossômico dominante que resultaram no mapeamento de 10 *loci* de otosclerose, embora apenas 8 destas localizações terem sido publicadas: OTSC1(15q25-26); OTSC2 (7q34-q36); OTSC3 (6q21.3-22.3); OTSC4 (16q21-23.2); OTSC5 (3q22-q24); OTSC6; OTSC7 (6q13-16.1); OTSC8 (9q13.1-9q21.11); OTSC9 e OTSC10 (1q41-44) ^[19-25].

Apesar do conhecimento das suas localizações, estes *loci* têm grandes dimensões, englobam vários genes, o que dificulta a identificação do gene causador de doença. Até à data não foram identificados nestes locais genes causadores de doença, contudo, com o surgimento de novas técnicas de investigação genética vários autores relatam que este será um próximo passo na investigação sobre esta patologia.

COL1A1

Como na base da osteogénese imperfeita estão mutações nos genes do colagénio tipo I, e esta doença partilha achados clínicos e histológicos com a otosclerose, McKenna *et al* investigaram uma possível etiologia em comum das duas doenças e, em 1998, o gene COL1A1 foi o primeiro a ser associado à otosclerose ^[26] através da demonstração da

associação deste com otosclerose numa pequena população de indivíduos de descendência europeia ^[18]. Subsequentemente, essa associação foi reforçada com a identificação de diferentes SNP (*single nucleotid polymorphism*) em diferentes populações, mas mantendo uma associação significativa entre mutações de SNP do gene COL1A1 e pacientes com otosclerose em diferentes populações, com exceção de um estudo conduzido por Rodriguez *et al* ^[27] conduzido numa população espanhola. Posteriormente, já foram realizados mais estudo que continuaram a corroborar a associação mutação do gene COL1A1 com a otosclerose ^[26, 28, 29].

Uma hipótese para o mecanismo fisiopatológico despoletado pelo COL1A1 é que as variantes podem aumentar os transcritos do gene, aumentando assim a formação de COL1A1 $\alpha 1$ homotrimer e contribuindo para a deposição anormal de osso na cápsula ótica.

ANGIOTENSINA II

Angiotensina II tem um papel fundamental na inflamação e participa também na remodelação óssea via diversos fatores de crescimento e citocinas.

Dois polimorfismos genéticos do sistema renina-angiotensina-aldosterona foram associados a concentrações plasmáticas de angiotensina II mais elevadas (AGT M235T e ACE I/D), e foram também associadas a um maior risco relativo de desenvolver otosclerose num estudo conduzido numa população francesa de indivíduos caucasianos ^[13].

Em 2009, numa população belga-holandesa, de maiores dimensões, Schrauwen tentou reproduzir esta associação mas não foi objetivada, no entanto, o autor não descarta a possibilidade de existirem outras variantes AGT e ACE para além das supramencionadas que possam contribuir para a génese da otosclerose ^[30].

In vitro, angiotensina II estimulou a produção da citocina pró-inflamatória IL-6 e reduziu a atividade da fosfatase alcalina em culturas celulares otoscleróticas *osteoblast-like* ^[13].

É necessária investigação adicional para complementar a informação sobre o papel da angiotensina II nas vias de inflamação e os seus efeitos particulares ao nível da

remodelação óssea da cápsula ótica, com o intuito de esclarecer qual o papel na contribuição destas variantes na fisiopatologia da otosclerose.

TGF- β 1

Moléculas da superfamília de citocinas TGF- β (*transforming growth factor beta*) têm um papel fundamental na remodelação óssea ^[18]. TGF- β 1 é um membro desta família e tem um papel preponderante no desenvolvimento embrionário e manutenção da remodelação óssea da cápsula ótica em conjunto com outras citocinas e proteínas, como OPG (*osteoprotegerin*), RANK (*receptor activator of nuclear factor-kappa B*) e RANKL (*RANK ligand*) ^[31].

Em culturas de células de osso otosclerótico humano, foi demonstrado que TGF- β 1 altera a expressão dos glicosaminoglicanos, fibronectina e colagénio da matriz celular externa ^[18].

Para corroborar estes resultados *in vitro*, em 2 estudos populacionais independentes de grandes dimensões conduzidos em populações europeias, mutações no TGF- β 1 foram associadas a otosclerose ^[32, 33].

BMP2 E BMP4

BMP2 (*bone morphogenetic 2*) e BMP4 (*bone morphogenetic 4*) são também membros da superfamília de citocinas TGF- β , estes são genes que obtêm nível de significância em dois estudos de associação com otosclerose ^[34, 35]. Evidência acrescida do papel das BMPs na progressão da otosclerose foi dada por diferentes estudos de expressão proteica que demonstraram a presença de BMPs em focos ativos de otosclerose ^[34].

A informação recolhida no estudo conduzido por Ealy *et al* sugere que variantes comuns de BMP2 e BMP4 não são fatores genéticos *major* na contribuição para a otosclerose na população alemã em que foi elaborado.

Foram encontradas raras variantes associadas a otosclerose e foi efetuado um estudo funcional destas para saber se se traduziriam num mecanismo fisiopatológico comum.

Algumas das mutações condiziram a uma diminuição da via de sinalização *Smad*, sugerindo que a perda deste sinal contribui para a patogénese da otosclerose [34].

Os autores que elaboraram este estudo levantaram a hipótese de que a diminuição da sinalização *Smad* proveniente de variantes em diferentes componentes da via de sinalização provoca um distúrbio na natureza estática da cápsula ótica, levando assim à remodelação óssea ativa em pacientes com otosclerose portadores destas raras variantes [34].

RELN

Foi reportada uma forte associação entre a otosclerose e o cromossoma 7q22.1. Demonstrou-se que mais do que uma variante do gene RELN está associada a otosclerose, tendo sido encontrada expressão de RELN no estribo humano e de ratinhos [36, 37]. Para além deste estudo, trabalhos elaborados posteriormente também corroboraram esta relação, no entanto, houve outros que não a conseguiram reproduzir [38]. De forma particular, em 2018, Mowat *et al*, identificou uma forte associação entre a variante do gene RELN, rs39399, e otosclerose familiar, que não foi verificada nos casos de otosclerose esporádica [16], no entanto o isolamento desta variante com demonstração de forte associação com otosclerose não foi reproduzível noutras populações.

O gene RELN codifica a relina, uma proteína da matriz extracelular de grandes dimensões. Esta tem um papel crucial na regulação primária das interações neuronais e neuroglia, o que é um passo crítico para o posicionamento celular e também para a migração neuronal final durante o desenvolvimento do cérebro humano. As suas funções conhecidas são difíceis de relacionar com a otosclerose [36].

SERPINF1

Na última década o desenvolvimento de novas técnicas para investigação do genoma humano e a sua tradução clínica tem perpetuamente avançado. Uma das novas técnicas é a WES (*Whole exome sequencing*) – análise dos exões ou regiões codificantes de milhares de genes simultaneamente usando técnicas de sequenciação da próxima geração. Através da sequenciação do exoma de um paciente e a comparação deste com

uma sequência de referência normal, é possível identificarem-se as variações na sequência de DNA do indivíduo e correlacioná-las com as preocupações médicas com o intuito de descobrir a causa da condição médica. A taxa de diagnóstico molecular é mais alta que muitos dos outros testes genéticos comparáveis, incluindo estudos cromossômicos e análise de *microarrays* cromossômicos. Achados incidentais secundários foram observados em baixa taxa ^[39].

Um estudo publicado em 2016 usou esta técnica inovadora pela primeira vez no estudo da base genética da otosclerose. Analisaram, usando a WES, o genoma de 4 famílias com otosclerose com padrão de hereditariedade dominante e, posteriormente, analisaram o DNA dos indivíduos de uma coorte de 84 pessoas com otosclerose (casos de otosclerose familiar e esporádica) ^[7].

Como resultado foram identificadas e estudadas 6 raras mutações no gene SERPINF1 (*Serpin Peptidase Inhibitor, Clade F*), que codifica o PDGEF (*pigment epithelium-derived growth factor*), um potente inibidor da angiogénese e um conhecido regulador da densidade óssea ^[7]. A angiogénese já foi proposta como fator chave no desenvolvimento de otosclerose clínica devido ao sinal de Schwartze e ao elevado débito do fluxo sanguíneo no promontório na fluxometria doppler em pacientes com otosclerose clínica ^[7].

Três mutações são *missence*, com resultado previsível deletério para a função proteica. As outras três mutações estão localizadas em 5'-UTR *alternative spliced transcript* de SERPINF1-012. A sequenciação de RNA demonstrou que SERPINF1 é o transcrito major do estribo humano. Estas 3 5'-UTR mutações são previstas localizarem-se nos locais de ligação do fator de transcrição e *reporter gene assays* confirmaram que estes afetaram os níveis de expressão génica ^[7].

Note-se ainda que a análise RT-qPCR do cDNA do estribo mostrou expressão reduzida de SERPINF1-012 em doentes com otosclerose, com e sem mutação SERPINF1, sugerindo que este pode ser um mecanismo fisiopatológico comum da doença ^[7].

Adicionalmente, foi recentemente, por meio desta nova ferramenta de investigação genética, identificadas mutações no gene SERPINF1 que resultam numa forma rara de osteogénese imperfeita tipo VI, outra doença que tem por base remodelação óssea ^[40].

DISCUSSÃO

Até à data, a gênese da otosclerose tem sido alvo de muitas investigações, existindo concordância entre os diferentes autores na importante componente genética, principalmente nos casos de otosclerose familiar, que representam uma parte significativa dos indivíduos com otosclerose.

Atualmente as opções terapêuticas são bastantes limitadas, podendo-se optar por tratamentos conservadores como próteses auditivas e terapêutica médica ou por tratamentos cirúrgicos:

- Prótese auditiva, um tratamento conservador para doentes cuja doença já revela afeção clínica mas ainda não representa um défice significativo o suficiente que compense na relação risco/benefício a cirurgia, para doentes que não possam ser submetidos a cirurgia dado o seu quadro clínico ou ainda para doentes que não aceitam ser submetidos a cirurgia;
- Fluoreto de sódio, a mais comumente prescrita nesta patologia, promove a remineralização e inibe o foco otosclerótico. Estudos mostraram que atrasa mas não impede nem reverte a fixação do estribo, e ensaios clínicos duplamente cegos mostraram que pode estabilizar o grau de audição, no entanto, também acarreta riscos a longo prazo, como artralgias, doença úlcera péptica, fascíte plantar dolorosa e nefrolitíase (terapêutica contraindicada em doentes com insuficiência renal);
- Bifosfonatos, mostraram ser superiores ao fluoreto de sódio no tratamento de outras doenças osteodistróficas, como a doença de Paget ou a osteogénese imperfeita, começando agora a ser mais usados no tratamento da otosclerose, sendo que os estudos existentes até à data mostraram que os bifosfonatos de segunda geração estabilizavam o nível de audição. Num estudo onde foram usados bifosfonatos de terceira geração, para além de estabilizarem a audição, os bifosfonatos melhoraram o quadro clínico em pacientes com otosclerose predominantemente coclear, tendo em alguns casos chegado mesmo a promover uma melhoria na audição a longo prazo. Porém, estes fármacos também apresentam efeitos secundário significativos, nomeadamente risco aumentado de fraturas atípicas do fémur, esofagite, doença úlcera péptica e osteonecrose da mandíbula ^[41];

- Estapedectomia (parcial ou completa) ou estapedotomia – terapêutica cirúrgica que, quando tem indicação, tem um sucesso reportado de 85 a 95% na resolução e/ou melhoria no défice auditivo de condução. Enquanto a primeira tem melhores resultados na recuperação do défice auditivo, principalmente ao nível das frequências mais baixas, a última tem menor taxa de complicações ao nível de lesões do ouvido interno ^[42].

Apesar do padrão de hereditariedade monogénico autossómico dominante, a baixa penetrância da doença dificulta a identificação de mutações causadoras de doença e consequentemente, qual o mecanismo fisiopatológico que geram. Atualmente, com recurso aos testes genéticos mais recentes como o WES, foi possível identificar-se o primeiro gene causador de doença e, através de estudos funcionais subsequentes, verificou-se que mesmo no grupo em que não foi identificada uma variante do gene SERPINF1, o seu transcrito *major*, SERPINF1-012, estava diminuído.

Deste modo, é necessário realizar análises funcionais das novas variantes identificadas e das mutações até à data identificadas que ainda não tenham este estudo já completado, uma vez que tal deverá ser feito com o intuito de saber se existe um mecanismo fisiopatológico comum a estas raras variantes e averiguar mais exhaustivamente sobre o seu mecanismo molecular.

Atente-se ainda para o facto da informação retirada do estudo funcional e aplicado na teorização do mecanismo molecular também poder levar a uma proposta e investigação de novas terapêuticas médicas para a otosclerose.

CONCLUSÃO

A otosclerose é uma causa relativamente comum de perda auditiva nos adultos jovens, estando a perda auditiva associada a um declínio cognitivo e funcional bem como a um aumento de incidência de algumas perturbações psiquiátricas, pelo que é importante conhecer a fisiopatologia desta doença e quem estará em risco acrescido de a vir a desenvolver, com o intuito de sinalizar estes indivíduos e tratar precocemente a patologia de base com o objetivo de minorar, controlar e prevenir as comorbilidades a ela associadas.

Sabendo que a genética é um fator importante na predisposição para esta patologia, é fundamental instigar a procura de quais os genes associados e quais os mecanismos fisiopatológicos a que estes se encontram associados.

Com os avanços nas técnicas genéticas foi possível superar alguns obstáculos até agora encontrados na investigação da génese da otosclerose, tendo sido publicado o primeiro trabalho a identificar um gene causador de doença em 2016 por Ziff *et al.*

Assim, com as novas técnicas de investigação molecular e genéticas, e com o avanço da Medicina no sentido de descobrir e tratar particularmente alvos específicos, encontrar genes causadores de doença e respetivos mecanismos moleculares subjacentes permitirão identificar novos potenciais alvos terapêuticos, pelo que num futuro hipotético será possível diminuir os números de cirurgias para esta doença, ter-se melhores opções de tratamento para pessoas não candidatas ou que recusam fazer a cirurgia e poderão ainda existir terapêuticas mais eficientes e/ou dirigidas à componente neurossensorial da otosclerose.

BIBLIOGRAFIA

1. Crompton, M., Cadge, B.A., Ziff, J.L., Mowat, A.J., Nash, R., Lavy, J.A., et al. (2019) The Epidemiology of Otosclerosis in a British Cohort. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 40, 22–30.
2. Tambs, K. (2004) Moderate effects of hearing loss on mental health and subjective well-being: Results from the Nord-Trøndelag hearing loss study. *Psychosomatic Medicine*, 66, 776–782.
3. Fritze, T., Teipel, S., Óvári, A., Kilimann, I. and Witt, G. (2016) Hearing Impairment Affects Dementia Incidence . An Analysis Based on Longitudinal Health Claims Data in Germany. 2016: 10.1371/journal.pone.0156876.
4. Monzani, D., Galeazzi, G.M., Genovese, E., Marrara, A. and Martini, A. (2008) Psychological profile and social behaviour of working adults with mild or moderate hearing loss. *Acta otorhinolaryngologica Italica : organo ufficiale della Società italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale*, 28, 61–66.
5. Manuscript, A. and Health, N. (2015) Hearing Impairment Associated With Depression in US Adults. 140, 293–302.
6. Nielsen, M.C., Martin-Bertelsen, T., Friis, M., Winther, O., Friis-Hansen, L., Lrgensen, N.R.J., et al. (2015) Differential gene expression in the otic capsule and the middle ear - An annotation of bone-related signaling genes. *Otology and Neurotology*, 36, 727–732.
7. Ziff, J.L., Saeed, S.R., Aldren, C.P., Crompton, M., Dawson, S.J., Powell, H.R.F., et al. (2016) Mutations and altered expression of SERPINF1 in patients with familial otosclerosis . *Human Molecular Genetics*, 0, ddw106.
8. Rekha, S., Ramalingam, R. and Parani, M. (2018) Pedigree Analysis and Audiological Investigations of Otosclerosis: An Extended Family Based Study. *Journal of Audiology and Otology*, 22, 223–228.
9. Sakihara, Y. and Parving, A. (1999) Clinical otosclerosis, prevalence estimates and spontaneous progress. *Acta Oto-Laryngologica*, 119, 468–472.
10. Morrison, A.W. (1967) Genetic factors in otosclerosis. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 41, 202–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5298472>.
11. BROWNING, G.G. and GATEHOUSE, S. (1992) The prevalence of middle ear disease in the adult British population. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*, 17, 317–321.
12. Kameswaran, S., Rajender Kumar, P. V., Jeyapaul, J.I. and Manoharan, S. (1976) Audiological and haematological studies on the Todas of Nilgiris. *The Journal of Laryngology & Otology*, 90, 325–333.
13. Rudic, M., Keogh, I., Wagner, R., Wilkinson, E., Kiros, N., Ferrary, E., et al. (2015) The pathophysiology of otosclerosis: Review of current research. *Hearing Research*, 330, 51–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heares.2015.07.014>.
14. Foster, M.F. and Backous, D.D. (2018) Clinical Evaluation of the Patient with Otosclerosis. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 51, 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2017.11.004>.
15. Arnold, W. (2007) Some remarks on the histopathology of otosclerosis. *Advances in Oto-Rhino-Laryngology*, 65, 25–30.
16. Lavy, J.A., Saeed, S.R., Dawson, S.J., Ziff, J.L., Crompton, M., Mowat, A.J., et al. (2018) Evidence of distinct RELN and TGFB1 genetic associations in familial and non-familial otosclerosis in a British population.

17. Danesh, A.A., Shahnaz, N. and Hall, J.W. (2018) The Audiology of Otosclerosis. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 51, 327–342. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2017.11.007>.
18. Babcock, T.A. and Liu, X.Z. (2018) Otosclerosis: From Genetics to Molecular Biology. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 51, 305–318.
19. Schattelman, I., Caethoven, G., Offeciers, F.E., de Heyning, P. Van, Smith, R.J.H., Van Den Bogaert, K., et al. (2002) A Second Gene for Otosclerosis, OTSC2, Maps to Chromosome 7q34-36. *The American Journal of Human Genetics*, 68, 495–500.
20. Tomek, M.S., Brown, M.R., Mani, S.R., Ramesh, A., Srisailapathy, C.R.S., Coucke, P., et al. (1998) Localization of a gene for otosclerosis to chromosome 15q25 – q26. 7, 285–290.
21. Brownstein, Z., Goldfarb, A., Levi, H., Frydman, M. and Avraham, K.B. (2006) Chromosomal mapping and phenotypic characterization of hereditary otosclerosis linked to the OTSC4 locus. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 132, 416–424.
22. Van Den Bogaert, K. (2004) A fifth locus for otosclerosis, OTSC5, maps to chromosome 3q22-24. *Journal of Medical Genetics*, 41, 450–453.
23. Thys, M., Van Den Bogaert, K., Iliadou, V., Vanderstraeten, K., Dieltjens, N., Schrauwen, I., et al. (2007) A seventh locus for otosclerosis, OTSC7, maps to chromosome 6q13-16.1. *European Journal of Human Genetics*, 15, 362–368.
24. Bel Hadj Ali, I., Thys, M., Beltaief, N., Schrauwen, I., Hilgert, N., Vanderstraeten, K., et al. (2008) A new locus for otosclerosis, OTSC8, maps to the pericentromeric region of chromosome 9. *Human Genetics*, 123, 267–272.
25. Weegerink, N.J.D., Schrauwen, I., Huygen, P.L.M., Pennings, R.J.E., Cremers, C.W.R.J., Van Camp, G., et al. (2011) Phenotype of the first otosclerosis family linked to OTSC10. *Laryngoscope*, 121, 838–845.
26. Murillo, L.R., Claes, C., Van Camp, G., Khalfallah, A., Huber, A., Smith, R.J.H., et al. (2012) COL1A1 association and otosclerosis: A meta-analysis. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 158A, 1066–1070.
27. Rodríguez, L., Rodríguez, S., Hermida, J., Frade, C., Sande, E., Visado, G., et al. (2004) Proposed association between the COL1A1 and COL1A2 genes and otosclerosis is not supported by a case-control study in Spain. *American Journal of Medical Genetics*, 128 A, 19–22.
28. Chen, W., Meyer, N.C., McKenna, M.J., Pfister, M., McBride, D.J., Fukushima, K., et al. (2007) Single-nucleotide polymorphisms in the COL1A1 regulatory regions are associated with otosclerosis. *Clinical Genetics*, 71, 406–414.
29. Dhouib, L., Masmoudi, S., Driss, N., Mnejja, M., Khalfallah, A., Ghorbel, A., et al. (2011) Association of COL1A1 and TGFB1 Polymorphisms with Otosclerosis in a Tunisian Population. *Annals of Human Genetics*, 75, 598–604.
30. Schrauwen, I., Thys, M., Vanderstraeten, K., Fransen, E., Ealy, M., Cremers, C.W.R.J., et al. (2009) No Evidence for Association Between the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Otosclerosis in a Large Belgian-Dutch Population. 2009.
31. Janssens, K., Ten Dijke, P., Janssens, S. and Van Hul, W. (2005) Transforming growth factor- β 1 to the bone.

32. Vincent, R., Ealy, M., Offeciers, E., Cremers, C.W.R.J., Thys, M., Dieltjens, N., et al. (2009) Detection of Rare Nonsynonymous Variants in TGFBI in Otosclerosis Patients. *Annals of Human Genetics*, 73, 171–175.
33. Van de Heyning, P., Dhooge, I., Cremers, C.R.W.J., Thys, M., Schrauwen, I., Vanderstraeten, K., et al. (2007) The coding polymorphism T263I in TGF- β 1 is associated with otosclerosis in two independent populations. *Human Molecular Genetics*, 16, 2021–2030.
34. Ealy, M., Meyer, N.C., Corchado, J.C., Schrauwen, I., Bress, A., Pfister, M., et al. (2014) Rare variants in BMP2 and BMP4 found in otosclerosis patients reduce smad signaling. *Otology and Neurotology*, 35, 395–400.
35. Schrauwen, I., Thys, M., Vanderstraeten, K., Franssen, E., Dieltjens, N., Huyghe, J.R., et al. (2008) Association of bone morphogenetic proteins with otosclerosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 23, 507–516.
36. Schrauwen, I., Ealy, M., Huentelman, M.J., Thys, M., Homer, N., Vanderstraeten, K., et al. (2009) A Genome-wide Analysis Identifies Genetic Variants in the RELN Gene Associated with Otosclerosis. *American Journal of Human Genetics*, 84, 328–338. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.01.023>.
37. Schrauwen, I., Venken, K., Vanderstraeten, K., Thys, M., Hendrickx, J.J., Franssen, E., et al. (2010) Involvement of T-cell receptor-B alterations in the development of otosclerosis linked to OTSC2. *Genes and Immunity*, 11, 246–253. <http://dx.doi.org/10.1038/gene.2010.3>.
38. Italia, S. (2013) The rs39335 polymorphism of the RELN gene is not associated with otosclerosis in a southern Italian population. 2013.
39. Yu, Z., Gonciarz, M.D., Sundquist, W.I., Hill, C.P. and Jensen, J. (2009) NIH Public Access. 377, 364–377.
40. Wang, J. yi, Liu, Y., Song, L. jie, Lv, F., Xu, X. jie, San, A., et al. (2017) Novel Mutations in SERPINF1 Result in Rare Osteogenesis Imperfecta Type VI. *Calcified Tissue International*, 100, 55–66.
41. Penido, N.D.O. (2018) Medicación en el tratamiento de Otosclerosis Sodium alendronate Sodium fluoride. *Otolaryngologic Clinics of NA*, 51, 441–452. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2017.11.006>.
42. Cirurgia estapédica na otosclerose: análise retrospectiva de resultados Stapes surgery for otosclerosis: retrospective analysis of outcomes (2010) 48.

AGRADECIMENTOS

Obrigado ao Prof. Dr. Óscar Dias pela compreensão e ajuda no desenvolvimento deste trabalho e também ao Dr. Marco Simão por me terem proporcionado e motivado na realização deste trabalho final de Mestrado.

Obrigado a todos os meus professores e tutores com quem me cruzei durante estes 6 anos de faculdade por me terem ajudado e motivado para progredir e ter sucesso no meu percurso.

Obrigado à minha família e amigos por me terem apoiado durante este importante e determinante período do meu percurso académico.